Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

PERMEABILITÄT DER ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENER TIERARTEN FÜR GELADENE UND UNGELADENE STOFFE

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Ingo Volkmer

1968

Dekan: Prof. Dr. F. Loew
Referent: Prof. Dr. K. Pfleger

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

PERMEABILITÄT DER ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENER TIERARTEN FÜR GELADENE UND UNGELADENE STOFFE

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Ingo Volkmer

Dekan: Prof. Dr. F. Loew

Referent: Prof. Dr. K. Pfleger

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 11. Juli 1968 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. METHODIK 7

1. Bestimmung des Eintritts von Polyolen in Erythrozyten 7
a) Methode nach WILBRANDT 8
b) Modifikation der Methode von WILBRANDT 9
c) Durchführung der photometrischen Messungen 11

2. Bestimmung des Eintritts von Fumarsäure in Erythrozyten 12
a) Bestimmung von ^{14}C 13
b) Durchführung der Messungen 14

3. Bestimmung des Eintritts von Tetramethylammonium 16

III. ERGEBNISSE 17

1. Untersuchungen mit Nichtelektrolyten 17
a) Zur Frage der kritischen Molekülgröße 17
b) Zur Frage der pH-Abhängigkeit des Porenradius 20
c) Zur Frage der effektiven Porenfläche 22
d) Zur Frage der Temperaturabhängigkeit des Eintritts von Polyolen 26

2. Untersuchungen mit Elektrolyten 27
a) Der Einfluß der Porenladung auf den Durchtritt von negativ geladenen Molekülen 27
b) Der Einfluß der Porenladung auf den Durchtritt von positiv geladenen Molekülen 35

IV. DISKUSSION 44

V. ZUSAMMENFASSUNG 54

VI. TABELLARISCHER ANHANG

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552721_0063

I. EINLEITUNG

Der Kaliumgehalt der Erythrozyten ist bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich. Man findet Arten, die einen hohen Kaliumgehalt haben - wie Mensch, Kaninchen oder Ratte - und Arten, bei denen der Kaliumgehalt der Erythrozyten sich nicht wesentlich von dem des umgebenden Plasmas unterscheidet - wie Katze und Hund (3). Schafe nehmen dabei eine Zwischenstellung ein: bei ihnen finden sich Tiere, deren Erythrozyten einen hohen Kaliumgehalt haben, und andere, deren Erythrozyten einen niederen Kaliumgehalt haben. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Unterschied von einem bestimmten Gen abhängig ist (3, 6, 25).

Dieser vom umgebenden Milieu verschiedene Kaliumgehalt wird durch einen Transportmechanismus aufrechterhalten, der Kalium nach innen und Natrium nach außen transportiert. Da aber die Erythrozytenmembran für Kationen nicht vollständig undurchlässig ist (zusammenfassende Literatur bei TOSTESON, 24) und in der Zellmembran Lecks vorhanden sind (2), durch die Kalium verlorengeht und Natrium eindringt, wird die Kalium-Natrium-Verteilung zwischen Zellinhalt und umgebendem Milieu durch zwei Größen bestimmt:

die Aktivität der Pumpe und Größe und Zahl der Lecks.

Über die Pumpe ist einiges bekannt. Es gibt Argumente, die dafür sprechen, daß eine von SKOU erstmals am Krabbennerven beschriebene (21) und von POST und Mitarbeitern (17) und von DUNHAM und GLYNN (4) am Erythrozyten nachgewiesene Kalium-Natrium-aktivierbare Membran-ATPase für den Transport verantwortlich ist (zusammenfassende Literatur bei SKOU, 1965, 22). Sie kommt beispielsweise bei Menschen- und Kaninchenerythrozyten vor und kann durch Ouabain gehemmt werden. Bei Katzenerythrozyten ließ sich keine Kalium-Natrium-aktivierbare ATPase isolieren und auch kein Kaliumtransport nachweisen (9). Die Kalium-Natrium-Verteilung der Katzenerythrozyten entspricht folgerichtig auch weitgehend der des Serums (3).

Vergleichende Untersuchungen, die sich mit der Frage nach der Größe der Poren bei den einzelnen Arten beschäftigen, liegen unseres Wissens noch nicht vor. Da neben der Aktivität der Pumpe die Größe der Lecks für die Lage des Verteilungsgleichgewichtes von intra- und extrazellulärem Kalium und Natrium mitbestimmend ist, haben wir uns damit beschäftigt.

Der Durchtritt von Stoffen durch eine poröse Membran wird durch drei Größen bestimmt: durch das L u m e n der Poren, am besten beschrieben durch den äquivalenten Porenradius, durch die A n z a h l der Poren und durch die L a d u n g der Poren.

Die Dimension der Poren liegt zur Zeit noch unter dem Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskopes. Sie kann deshalb nur durch Stoffe definierter Molekülgröße bestimmt werden. Da die Erythrozytenmembran zu etwa 30 % aus Lipoiden aufgebaut ist (19) und vermutlich deshalb Stoffe aufgrund ihrer Lipoidlöslichkeit durchlassen kann, eignen sich zur Bestimmung des Porenradius demzufolge nur Stoffe, die eine vernachlässigbare Lipoidlöslichkeit besitzen, die gut wasserlöslich und nicht ionisiert sind. Diesen Forderungen entsprechen die Polyole Äthylenglycol, Glycerin, Erythrit, Adonit und Mannit. Ein weiterer Vorteil ist der, daß sie im Stoffwechsel der Erythrozyten nicht verändert werden. Trotzdem muß für Glycerin eine Einschränkung gemacht werden, da der Durchtritt im Bereich von pH 8 mit Kupfer hemmbar ist, und da es nach Ansicht von JACOBS und LEFEVRE aktiv durch die Zellmembran transportiert wird (10, 13). Treffen die genannten Voraussetzungen wenigstens für die übrigen Polyole

zu, so sollten sich bei der Prüfung des Durchtritts von Molekülen einer homologen Reihe an Erythrozyten verschiedener Spezies Moleküle bestimmter Größe finden lassen, die gerade nicht mehr einzudringen vermögen, so daß mit deren Hilfe die Abschätzung des äquivalenten Porenradius möglich ist.

Beim Vorhandensein von Fixladungen in den Poren sollten gleich geladene Stoffe am Durchtritt viel stärker behindert werden als entgegengesetzt geladene. Für derartige Untersuchungen würden sich die Halogene eignen, die nach allgemeiner Ansicht am Erythrozyten keinem Transport unterliegen. Sie dringen jedoch so schnell in den Erythrozyten ein, daß der Durchtritt ohne großen technischen Aufwand nicht verfolgt werden kann (zusammenfassende Literatur bei PASSOW, 15). Zweiwertige Anionen dagegen treten viel langsamer in den Erythrozyten ein. GIEBEL und PASSOW benutzten für derartige Untersuchungen an Rindererythrozyten Dicarbonsäuren verschiedener Kettenlänge (8). Als Testmolekül wählten wir die Fumarsäure aus: sie ist ^{14}C-markiert zu erhalten und so verhältnismäßig leicht bestimmbar.

Fixladungen sind je nach der chemischen Natur ihrer Träger und der in ihrer Umgebung vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration unterschiedlich stark

dissoziiert. Nimmt man an, daß der pK-Wert der Poren in der Gegend von 7,0 liegt, dann bedeutet das, daß sie im physiologischen Bereich zu rund 50 % dissoziiert sind und, daß sich bei einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration die Zahl der Ladungen sehr stark ändert. Diese Abhängigkeit läßt sich durch eine Behinderung oder Erleichterung des Durchtritts eines Testmoleküls nachweisen. Das gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die externe Wasserstoffionenkonzentration bis in die Poren hinein wirksam ist. Nach Untersuchungen über den Sulfat- und den Phosphatdurchtritt scheint das zuzutreffen (15, 20).

Es sollte daher möglich sein, mit Hilfe der Messung des Durchtritts von geladenen Stoffen bei verschiedenen pH-Werten einen Hinweis auf den pK-Wert der den Durchtritt beeinflussenden Gruppen zu gewinnen. Diese Überlegungen gelten aber nur dann uneingeschränkt, wenn der Porenradius selbst von der Wasserstoffionenkonzentration nicht verändert wird. Frühere Untersuchungen zeigten, daß der Phosphat- (20) und der Natriumdurchtritt (16) bei pH 6,6 und der Kaliumverlust (16) bei pH 7,2 ein Maximum besitzen. Dabei handelt es sich jedoch um Ionen, so daß eine Entscheidung der Frage, inwieweit eine

räumliche oder eine elektrische Änderung dafür verantwortlich ist, nicht möglich war. Eine eindeutige Auskunft ist nur bei Verwendung von elektrisch indifferenten Testmolekülen zu erwarten: eine pH-abhängige Änderung des Porenradius würde sich in einer Änderung der Durchtrittsgeschwindigkeit und der kritischen Molekülgröße bemerkbar machen. Aus diesem Grund wurde der Durchtritt der Polyole zwischen pH 6,0 und 8,0 studiert.

II. METHODIK

1. Bestimmung des Eintritts von Polyolen in Erythrozyten

Zur Bestimmung der Aufnahme von Polyolen in Erythrozyten stehen zwei Wege zur Verfügung. Es kann versucht werden, die aufgenommenen Polyole direkt mit einer chemischen Methode - eventuell nach vorheriger Chromatographie - zu bestimmen. Jedoch ist hierzu notwendig, die Erythrozyten mehrmals zu waschen, um auch den Anteil an Polyolen zu beseitigen, der nach scharfem Zentrifugieren im Extrazellulärraum verbleibt. Bei den sehr schnellen Durchtrittsraten, die bei C_2- und C_3-Polyolen gefunden wurden, schien es jedoch unmöglich, infolge der für den Waschvorgang benötigten Zeit von fünf Minuten zu sicheren Ergebnissen zu kommen. Wir entschlossen uns deshalb, den Eintritt der Polyole indirekt über die Zunahme des Erythrozytenvolumens zu bestimmen. Bringt man nämlich Erythrozyten in eine Lösung, deren Isotonie zum größten Teil durch nicht geladene Stoffe wie Polyole oder Zucker hergestellt wurde, so verteilen sich diese Stoffe nach den Gesetzen der Diffusion auf den gesamten erreichbaren Raum. Wenn es die Porengröße der Membran er-

laubt, dringen sie also auch in die Erythrozyten ein, wodurch deren osmotischer Inhalt zunimmt. Da Wasser gut penetrieren kann, vergrößert sich das Erythrozytenvolumen bis erneut osmotisches Gleichgewicht zwischen innen und außen besteht. Dieses Vorgehen hat allerdings den Nachteil, daß die Versuche aufgrund der notwendigen Konzentration an Polyolen nur in einem künstlichen Suspensionsmedium und nicht im Blut durchgeführt werden können.

a) Methode nach WILBRANDT

WILBRANDT (26) zeigte, daß die Lichtstreuung, die auftritt, wenn ein gebündelter Lichtstrahl durch eine Erythrozytensuspension geschickt wird, dem Volumen der in dieser Suspension vorhandenen Erythrozyten umgekehrt proportional ist. WILBRANDT bestimmte in seiner Methode die Schwächung des Lichtes durch eine Erythrozytensuspension bestimmter Verdünnung. Dabei benützte er den Erythrozyten als Osmometer, indem er die Erythrozytensuspensionen in Kochsalzlösungen verschiedener Osmolarität einbrachte und diejenige Osmolarität bestimmte, bei der alle Erythrozytensuspensionen gleiche Lichtstreuung zeigten. Daraus läßt sich der von der Zellmembran umschlossene osmotische Inhalt des Erythro-

zyten berechnen. Unter der Voraussetzung, daß unter den Versuchsbedingungen und innerhalb der Versuchszeit kein osmotisch wirksamer Inhalt verlorengeht, ist - auf unsere Fragestellung angewendet - die Zunahme der Lichtstreuung ein Maß für die in die Erythrozyten eintretenden Stoffe.

b) Modifikation der Methode von WILBRANDT

Da uns im Gegensatz zu WILBRANDT im Photometer Eppendorf ein kommerzielles, sehr empfindliches und als Wechselstromverstärker über lange Meßzeiten stabiles Photometer zur Verfügung stand, konnten wir direkt das von den Erythrozyten gestreute Licht messen. Ein hinsichtlich der Lichtstreuung definiertes Filter und ein Streulichtstandard gleicher Abmessung wie die Erythrozytenmeßküvette gestatteten dabei, die Apparatekonstanten Lichtintensität und Empfindlichkeit reproduzierbar einzustellen. Eine schematische Darstellung der Versuchsanordnung zeigt Abbildung 1. Während der Durchführung der Versuche zeigte sich sogar, daß das Einpipettieren der Erythrozyten zu jeder Meßzeit in eine Reihe steigender Osmolarität überflüssig war. Die Erythrozyten wurden lediglich zur Verdünnung in eine isotone,

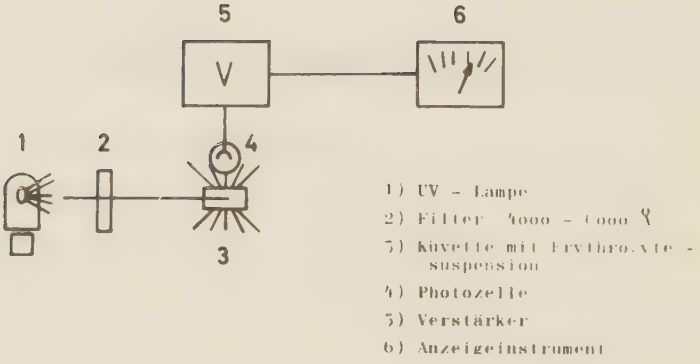

Abb. 1

Versuchsanordnung der Photometerversuche

0,9 prozentige Kochsalzlösung eingebracht und die Lichtstreuung gemessen. Bei sehr schnell eindringenden Polyolen war es sogar möglich, die zu testenden Erythrozyten direkt in die polyolhaltige, isotone Testlösung einzupipettieren und die Lichtstreuung zu verfolgen.

c) Durchführung der photometrischen Messungen

Das Blut wurde bei den größeren Tieren aus einer Vene, bei den kleineren durch Herzpunktion gewonnen und durch Rühren mit einem Holzstäbchen defibriniert. Nach Abkühlen auf etwa 4^{o} C wurde 1 ml Blut mit 25 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und bei 3500 Umdrehungen pro Minute während 5 Min. abgeschleudert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Erythrozyten in 10 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung suspendiert: 8 ml isotone (0,3 molare) Lösung von Erythrit, Adonit oder Mannit, dazu 2 ml isotonen Phosphatpuffer nach SØRENSEN von pH 6.5, 7.0 und 7.5. Nach Inkubieren in einem Wasserbad von 27^{o} C wurden in Abständen von 10 Minuten Meßproben von 0,5 ml entnommen und in 10 ml gepufferte physiologische NaCl-Lösung gegeben (8 ml NaCl und 2 ml isotoner Phosphatpuffer von pH 7,0). Diese

Lösung war zuvor auf 5^{o} C abgekühlt worden. Der Wert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde kurz vor dem Inkubieren entnommen. Die einzelnen Erythrozytensuspensionen wurden mit der Kochsalzlösung gut vermischt. Dann wurde im Photometer die Lichtstreuung bestimmt.

Die Versuche mit Äthylenglycol und Glycerin wurden wegen ihrer schnellen Penetrationsfähigkeit so verändert, daß die Erythrozyten aus 2 ml Blut in 4 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert wurden. 0,1 ml des Ansatzes wurde mit 10 ml isotoner Glycerin- bzw. Äthylenglycollösung vermischt, die zuvor in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 7^{o}, 17^{o} bzw. 27^{o} C gebracht worden war. Im Photometer wurden dann bis zur Hämolyse ständig die Meßwerte abgelesen.

2. Bestimmung des Eintritts von Fumarsäure in Erythrozyten

Der Ein- und Austritt von mehrwertigen Anionen in Erythrozyten ist besonders bei tiefen Temperaturen so langsam, daß dabei - im Gegensatz zu Polyolen - eine Methode angewandt werden konnte, die ein mehrmaliges Waschen erfordert. Da die ausgewählte

Dicarbonsäure zudem noch als ^{14}C-Verbindung mit hoher spezifischer Aktivität käuflich zu erhalten war, konnte sie in einer Konzentration von 1 µMol/ml zugesetzt werden. Die aufgenommene Dicarbonsäure wurde dann nach dreimaligem Waschen der Erythrozyten durch die Messung des ^{14}C-Gehaltes bestimmt.

a) Bestimmung von ^{14}C

^{14}C ist ein reiner Betastrahler mit 0,155 MeV und einer Halbwertszeit von 5568 Jahren, der im Reaktor mit langsamen Neutronen durch Bestrahlung von Be_3N_2 [14] gewonnen wird. Dabei läuft folgende Kernreaktion ab: ^{14}N (n, p) ^{14}C. Die geringe Energie der Betastrahlung stellte meßtechnisch bisher ein Problem dar. Ein Großteil der Strahlung wird bereits in der Probe selbst absorbiert. Der größte Teil des Restes wurde früher in den Zählrohren selbst mit dünnwandigen Fenstern zurückgehalten. Hier brachte die Verwendung fensterloser Methan- oder Heliumdurchflußzählrohre einigen Fortschritt. Die Zählausbeute betrug 1 - 2 %. Mit den neuen Flüssigkeitsszintillationszählern lassen sich je nach Vorgehen bis zu 50 % der Strahlung erfassen.

Eine Schwierigkeit für das Arbeiten mit biologischem Material bestand zunächst darin, daß die Proben in eine Form gebracht werden mußten, in der sie in organischen Lösungsmitteln, zum Beispiel Toluol, löslich sind, denn nur in diesen Lösungsmitteln lassen sich die bisher zur Verfügung stehenden Fluoreszenzstoffe durch Betastrahlung anregen. Die zusätzliche Anwendung von Naphtalin gestattete aber nunmehr die Verwendung von Dioxan, das mit Wasser unbegrenzt mischbar ist, als Lösungsmittel. Bei gleicher Behandlung von Versuchsproben, eingesetzter Gesamtaktivität usw. läßt sich dabei eine Fehlbeurteilung der gemessenen Impulszahlen durch unterschiedliches Quenching ausschalten, was zusätzlich durch Beimischung bekannter Aktivitäten (innerer Standard) kontrolliert wurde.

b) Durchführung der Messungen

Nach der Gewinnung des Blutes in der bei den Polyolen beschriebenen Weise wurden 9 ml Blut zur pH-Einstellung mittels Glaselektrode mit soviel 0,3 n HCl versetzt, daß die pH-Werte 6,5, 7,0 und 7,5 betrugen. Dazu waren durchschnittlich etwa 1,4, 0,8 und 0,25 ml 0,3 n HCl notwendig. Die entstehen-

den Volumendifferenzen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeglichen. Zu den Erythrozyten wurden 0,1 ml mit 7,8 µMol ^{14}C-markierter Fumarsäure gegeben. (Die ^{14}C-Aktivität betrug 1 µC pro Ansatz. Die ^{14}C-Fumarsäure war von "THE RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM, BUCKINGHAMSHIRE, ENGLAND" mit der Chargennummer DS4223 bezogen worden.) Nach Durchmischen der Proben wurden die Ansätze in einem Wasserbad bei 27^{o} C inkubiert. In Abständen von 5, 10, 20, 40, 60, 120 und 180 Minuten wurde aus dem Ansatz 0,1 ml entnommen, in 10 ml auf 5^{o} C vorgekühlte physiologische Kochsalzlösung gegeben und bei 3500 Umdrehungen pro Minute während 5 Minuten bei 4^{o} C abzentrifugiert. Die Erythrozyten wurden dann nach dreimaligem Waschen in physiologischer NaCl-Lösung mit 2 ml Wasser hämolysiert und durch Zugabe von 0,5 ml 20 prozentiger Trichloressigsäure enteiweißt. Nach 30 Minuten Stehen in der Kälte wurde durch scharfes Abzentrifugieren der Bodensatz vom Überstand getrennt. 1 ml des Überstandes wurde in ein "Tricarb"-Probegläschen gegeben. Mit einer 10 ml Spritze wurden 9 ml Szintillationsflüssigkeit so hinzugegeben, daß eine intensive Durchmischung erfolgte. Die Proben wurden dann nach Abkühlen im "Tricarb" jeweils 10 Minuten gemessen.

3. Bestimmung des Eintritts von Tetramethylammonium

Die Messung der Aufnahme von Tetramethylammonium (TMA) durch die Erythrozyten erfolgte in analoger Weise wie bei den Versuchen mit Fumarsäure, d.h. über die Bestimmung von ^{14}C. Das TMA wurde uns von Dr. Schmidt vom Biochemischen Institut der Universität des Saarlandes in dankenswerter Weise synthetisiert.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen mit Nichtelektrolyten

a) Zur Frage der kritischen Molekülgröße

Die Abbildung 2 zeigt die verwendeten Testmoleküle und ihre mittleren Molekülradien. Diese wurden mittels Atomkalotten nach STUART und BRIEGLEB (Firma Leybold, Köln) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{mittlerer Molekülradius} = 0{,}5 \sqrt[3]{(d_1 d_2 d_3)} \qquad (23)$$

Einzelheiten dazu finden sich in Tabelle 1 des Anhangs. Andererseits läßt sich der mittlere Molekülradius auch aus der Dichte des reinen Stoffes, dem Molekulargewicht und der Avogadroschen Zahl nach folgender Formel berechnen:

$$\text{mittlerer Molekülradius} = \sqrt[3]{\frac{3\,M}{4\,\pi\,\varphi\,N}} \qquad (18)$$

Dabei bedeutet M = Molekulargewicht in g, N = Avogadrosche Zahl, φ = Dichte.

In der Tabelle 1 ist das Ergebnis vergleichender Untersuchungen an den Erythrozyten verschiedener Spezies zusammengestellt. (Die Einzelergebnisse finden sich jeweils im Anhang.) Bei allen Erythrozyten

		Aethylenglycol	Glycerin	Erythrit	Adonit	Mannit
		H HCOH HCOH H	H HCOH HCOH HCOH H	H HCOH HCOH HCOH HCOH H	H HCOH HCOH HCOH HCOH HCOH H	H HCOH HCOH HCOH HCOH HCOH HCOH H
Å	St. & Br.	2,70	3,06	3,45	3,53	3,72
	Dichte	2,78	3,04	3,30	—	3,65

Abb. 2

Größenvergleich der benützten Polyole.

Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf den mittleren Molekülradius [Å]. Sie wurden berechnet nach $0{,}5\ \sqrt[3]{d_1 d_2 d_3}$ (STUART und BRIEGLEB) bzw. nach $\sqrt[3]{\frac{3\ M}{4\pi\ \varphi\ N}}$ (Dichte). Einzelwerte finden sich in Tab. 1 des Anhangs.

Erythrozyten von	Erythrit	Adonit	Mannit
Ratte	+ +	+	-
Mensch	+ +	+	-
Kaninchen	+	-	-
Meerschweinchen	+	-	-
Schwein	+	-	-
Hund	+	-	-
Rind	+	-	-
Katze	+	-	-

Tab. 1

Vergleichende Untersuchungen über die Aufnahme von Polyolen in Erythrozyten verschiedener Spezies.

+ = Aufnahme - = keine Aufnahme

kann Erythrit die Membran gut penetrieren. Für das um ein C-Atom größere Adonit waren nur die Erythrozyten von Mensch und Ratte durchlässig. Für das noch um ein weiteres C-Atom größere Mannit waren schließlich die Membranen aller geprüften Erythrozytenarten undurchlässig.

b) Zur Frage der pH-Abhängigkeit des Porenradius

Nachdem die kritische Molekülgröße für die einzelnen Arten bekannt war, konnte geprüft werden, ob der Porenradius mit der Wasserstoffionenkonzentration eine Änderung erfährt.

Ein Vergleich des Eindringens von Erythrit bei Rinder-, Schweine-, Kaninchen-, Katzen- und Hunderythrozyten sowie Adonit bei Menschen- und Rattenerythrozyten mit Hilfe der optischen Methode ergab zwischen pH 6,0 und 8,0 keine Unterschiede (Einzelwerte siehe Anhang Tabelle 2a-h und Tabelle 3a und b). Als repräsentativ ist in Abbildung 3 die Erythritaufnahme in Kaninchenerythrozyten in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration wiedergegeben. Bei Adonit nahm bei den einzelnen Erythrozytenarten - ausgenommen Ratte und Mensch - die

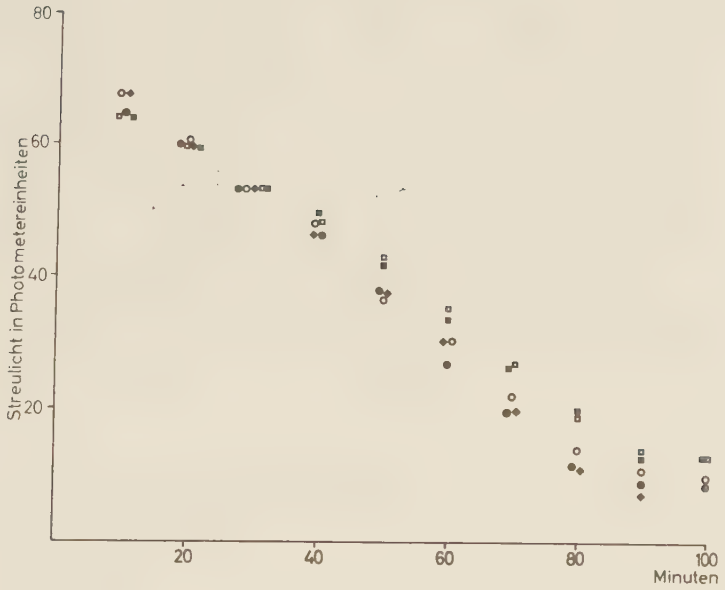

Abb. 3

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Erythrit in Kaninchenerythrozyten.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Streulicht in Photometereinheiten.

●= pH 6,0; ○= pH 6,5; ◇= pH 7,0;

■= pH 7,5; □= pH 8,0.

Einzelwerte finden sich in Tabelle 2c des Anhangs.

Lichtstreuung zu (Auf eine Wiedergabe der Einzelwerte wurde verzichtet.). Dies ist auf einen Verlust osmotisch wirksamen Inhaltes zurückzuführen. Besonders deutlich läßt sich dies bei Katzenerythrozyten zeigen. Bei der Katze wurde deshalb neben der Messung der Lichtstreuung gleichzeitig flammenphotometrisch Natrium in der Außenlösung bestimmt. Wie die Abbildung 4 deutlich macht, zeigen Photometerausschlag und Natriumverlust ein spiegelbildliches Verhalten, wodurch sich die Annahme als richtig herausgestellt hat.

c) Zur Frage der effektiven Porenfläche

Vergleichende Untersuchungen mit Erythrit.

Da die Lichtstreuung dem osmotisch wirksamen Inhalt umgekehrt proportional ist (26), haben alle Erythrozytenarten bei gleicher Abnahme des Streulichtes - zum Beispiel auf die Hälfte des Ausgangswertes - die gleiche osmotisch wirksame Menge an Polyolen aufgenommen. Die Zeit bis zur Erreichung dieses Wertes kann somit als Halbwertszeit ($^{t}/2$) der Abnahme der Lichtstreuung für den Vergleich herangezogen werden. Die aus Mittelwertskurven der Einzel-

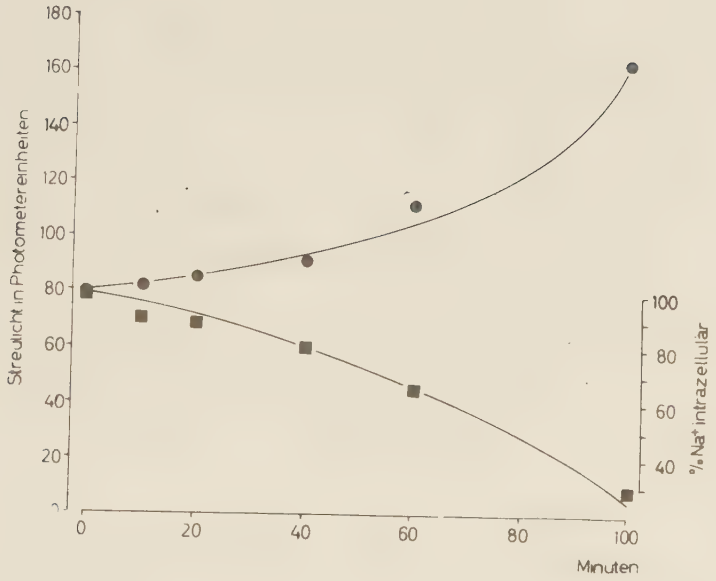

Abb. 4

Natriumverlust von Katzenerythrozyten in einer isotonen Adonitlösung (pH 7,5).

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinaten: links Streulicht in Photometereinheiten.
rechts % Natrium intrazellulär.

●——● Abnahme des Erythrozytenvolumens.

■——■ Abnahme des intrazellulären Natriums.
100 % Na^+ = 165 µMol Na^+ pro ml Erythrozyten.

Einzelwerte finden sich in Tabelle 4 des Anhangs.

werte in Tabelle 2 und 3 des Anhangs graphisch bestimmten Halbwertszeiten sind in Tabelle 2 der Größe nach geordnet zusammengestellt. Die Tabelle zeigt, daß bei Ratten- und Menschenerythrozyten die Durchtrittsgeschwindigkeit für Erythrit am höchsten ist. Bei Kaninchen und Meerschweinchen macht sie nur die Hälfte bzw. ein Drittel davon aus. Alle übrigen erreichen nur ein Viertel davon. Adonit, das in einem mit der optischen Methode nachweisbaren Umfang nur in Ratten- und Menschenerythrozyten einzudringen vermag, erreicht eine Durchtrittsrate, deren Höhe ungefähr der des Erythrits bei Hund und Katze entspricht.

Es stellt sich hier die Frage, ob der Unterschied zwischen Kaninchen und Katze beispielsweise auf einer unterschiedlichen Zahl von Poren pro Membranfläche beruht. Der Unterschied zwischen den Erythrozyten von Ratte bzw. Mensch und den übrigen Arten kann mindestens zum Teil dadurch verursacht sein, daß größere Poren vorhanden sind. Da es sich nicht entscheiden läßt, inwieweit eine Verschiedenheit der Zahl oder der Größe der Poren für die unterschiedlichen Durchtrittsraten verantwortlich ist, erscheint es zweckmäßig, lediglich von einer effektiven Porengesamtfläche zu sprechen. Demnach kann

Erythrozyten von	$t_{1/2}$ in Minuten	
	Erythrit	Adonit
Ratte	28	145
Mensch	29	200
Kaninchen	58	-
Meerschweinchen	95	-
Schwein	117	-
Hund	120	-
Rind	125	-
Katze	130	-

Tab. 2

Vergleichende Untersuchungen über die Penetrationsgeschwindigkeiten von Erythrit und Adonit.
Die Bestimmung der $t_{1/2}$ erfolgte durch graphische Auswertung der in Tabelle 2a-h und 3a und b im Anhang mitgeteilten Einzelwerte.

man feststellen, daß - gemessen am Eintritt von Erythrit - die Erythrozyten von Ratte und Mensch eine dreimal größere Porenfläche haben als die von Hund und Katze. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Porenpopulation bei den verschiedenen Arten möglichst einheitlich ist.

d) Zur Frage der Temperaturabhängigkeit des Eintritts von Polyolen

Die freie Diffusion folgt den Gasgesetzen, wobei die absolute Temperatur bestimmend ist (5):

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{T_1 \eta_2}{T_2 \eta_1}$$

D = Diffusionskoeffizient, T = absolute Temperatur, η = Reibungskoeffizient.

Da sich der Reibungskoeffizient mit der Temperatur stark ändert, wirkt sich dies auch auf die Diffusion aus. Niemals wird aber ein Q_{10} von 2,0, d.h. eine Änderung des Diffusionskoeffizienten um den Faktor 2 bei einer Temperaturänderung von 10^{o} C erreicht. Durchtrittsvorgänge durch biologische Membranen haben dagegen in der Regel einen Q_{10} von 2 und darüber.

Untersuchungen uber die Temperaturabhängigkeit des Durchtritts von ungeladenen Stoffen durch biologische Membranen wurden unseres Wissens nur von JACOBS durchgeführt, der bei Kaninchenerythrozyten fur Glycerin einen sehr niedrigen Q_{10} von etwa 1,4 findet (11). Wir haben deshalb den Eintritt von Äthylenglycol bei 7° und 17° C und den von Glycerin bei 7°, 17° und 27° C am Kaninchenerythrozyten studiert. In Abbildung 5 ist die Photometerkurve für Äthylenglycol und in Abbildung 6 diejenige für Glycerin wiedergegeben. Bei einem Vergleich der Kurven zeigt sich deutlich, daß bei einer Temperaturanderung von 10° C mehr als die doppelte Zeit benötigt wird, um gleiche Photometerwerte zu erreichen. Daraus laßt sich ein Q_{10} errechnen, der großer als 2 ist, für Glycerin sogar 3-4.

2. Untersuchungen mit Elektrolyten

a) Der Einfluß der Porenladung auf den Durchtritt von negativ geladenen Molekülen

Die Abhängigkeit des Fumarsäuredurchtritts von der Wasserstoffionenkonzentration bei verschiedenen Arten.

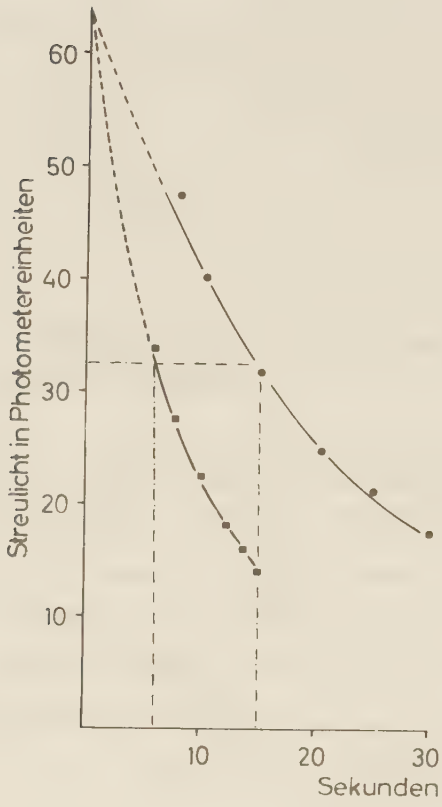

Abb. 5

Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme von Athylenglycol in Kaninchenerythrozyten.

Abszisse: Zeit in Sekunden.

Ordinate: Streulicht in Photometereinheiten.

●——●7° C, ■——■17° C, —·—·— markiert $^{t}/_{2}$

Der Photometerwert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde durch Rückwärtsverlängerung der Kurven erhalten (gestrichelter Teil), da aus methodischen Gründen der erste Wert frühestens nach 7 Sekunden abgelesen werden konnte.

Einzelwerte finden sich in Tabelle 5 des Anhangs.

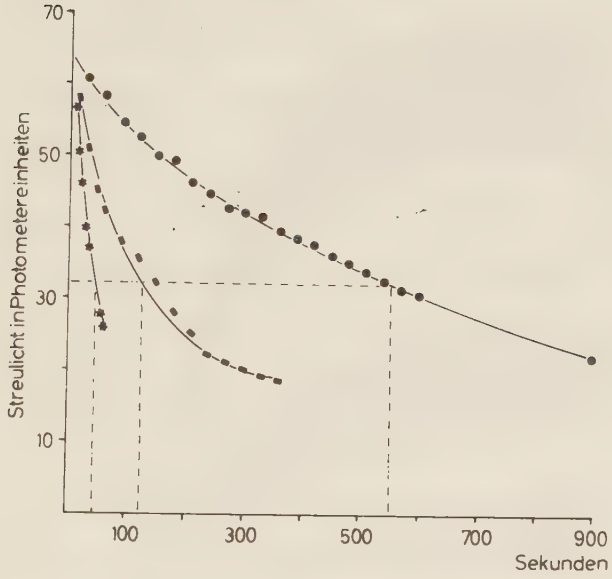

Abb. 6

Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme von Glycerin in Kaninchenerythrozyten.

Abszisse: Zeit in Sekunden.

Ordinate: Streulicht in Photometereinheiten.

●——●7° C, ■——■17° C, ✱——✱27° C,

–·–·–·–markiert $t/2$.

Einzelwerte finden sich in Tabelle 5 des Anhangs.

Die Penetration der Fumarsäure ist im Gegensatz zu den ungeladenen Polyolen in kennzeichnender Weise von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig (Abb. 7a). Wie die Abbildung zeigt, wird bei pH 6,5 und 7,0 nach 180 Minuten Versuchsdauer ein Gleichgewicht für Aufnahme und Abgabe der Fumarsäure erreicht. Dieses Gleichgewicht ist vom pH abhängig und ändert sich bei Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration um eine halbe pH-Einheit um den Faktor 2-3. Bezieht man die Aufnahmerate auf dieses Gleichgewicht(+), was in Abbildung 7b geschehen ist, so tritt deutlich hervor, daß auch die Aufnahmerate für die Fumarsäure mit steigender Wasserstoffionenkonzentration erhöht wird, d.h. die Durchlässigkeit der Erythrozytenmembran für Fumarsäure nimmt zu.

Diese Änderung des Gleichgewichtes kann auf eine pH-abhängige Änderung des Donnangleichgewichtes zurückgeführt werden, das am Erythrozyten aufgrund der besonderen Membranverhältnisse - hohe Durchlässigkeit für Anionen und eine um einige Zehnerpotenzen niedrigere Durchlässigkeit für Kat-

---

(+) Bei pH 7,5 ist dieses Gleichgewicht noch nicht erreicht und liegt etwas höher. Hinsichtlich unserer Aussage erscheint es erlaubt, den nach 180 Minuten erreichten Wert dem Gleichgewicht gleichzusetzen.

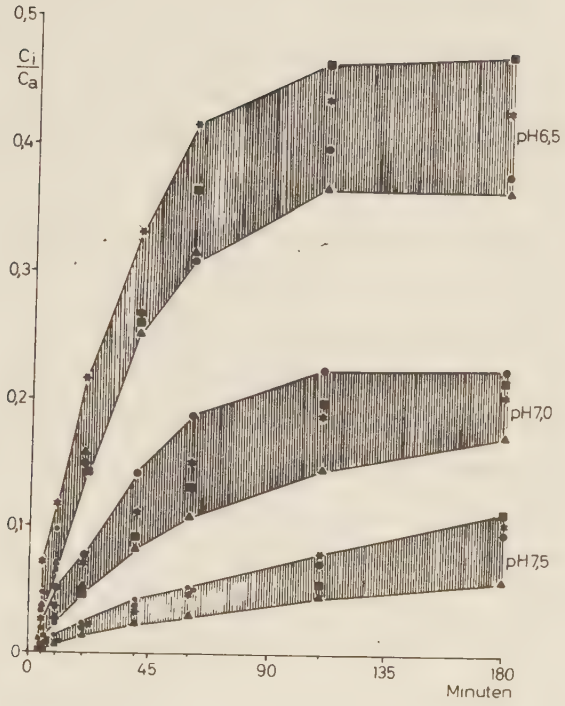

Abb. 7a

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Fumarsäure in Erythrozyten verschiedener Spezies.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Verhältnis der Innenkonzentration zur Außenkonzentration.

● Kaninchen; ▲ Hund; ■ Mensch; ✱ Ratte.

Einzelwerte finden sich in Tabelle 6a des Anhangs.

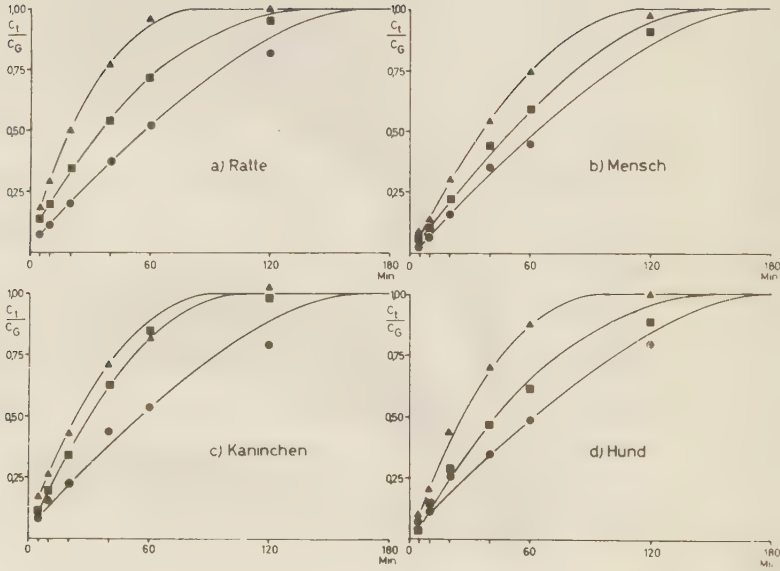

Abb. 7b

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Fumarsäure in Erythrozyten verschiedener Spezies.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Aufnahmerate bezogen auf das Gleichgewicht (Einzelheiten siehe Tabelle 6b im Anhang).

▲ = pH 6,5 ■ = pH 7,0 ● = pH 7,5

Einzelwerte finden sich in Tabelle 6b des Anhangs.

ionen - von folgenden Faktoren abhängig ist: Hämoglobin und Zellproteine, die den Inhalt des Erythrozyten ausmachen, enthalten negative und positive Fixladungen, deren Dissoziation von der Wasserstoffionenkonzentration bestimmt wird. Steigt die Zahl der Wasserstoffionen an, so nehmen die dissoziierten negativen Fixladungen ab, die positiven zu. Als Folge davon werden mehr Anionen, somit auch Fumarsäure, im Erythrozyten gebunden. Dies zeigt sich in einer Verschiebung des Gleichgewichtes nach oben. Gleichzeitig werden aber Kationen frei, die wegen ihrer Ladung den Erythrozyten nur langsam verlassen können. Zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität müssen deshalb zusätzlich Anionen von außen eindringen. Dies ist deshalb möglich, weil diese die Erythrozytenmembran leicht zu penetrieren vermögen. Der osmotisch wirksame Inhalt der Erythrozyten muß deshalb mit Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration ansteigen, was sich in einer Schwellung der Erythrozyten anzeigen sollte. Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigt Abbildung 8. Bei pH 7,5 beträgt der Wassergehalt pro Gramm Trokkengewicht der Erythrozyten beim Kaninchen 2,2 g, bei pH 7,1 2,4 g und bei pH 6,5 2,65 g. (Die Bestimmung des Wassergehaltes ergab sich aus der

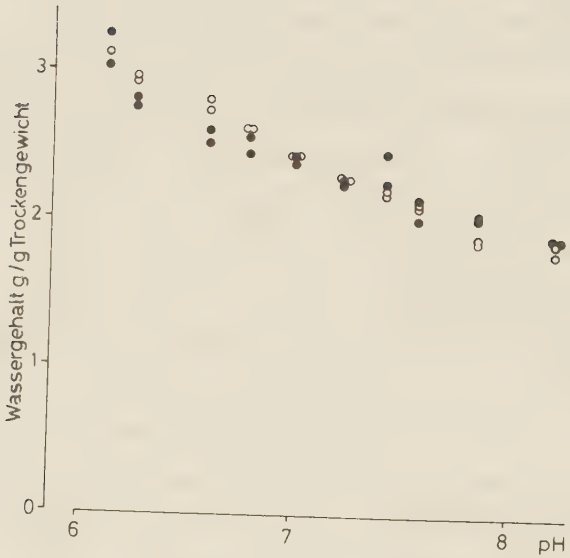

Abb. 8

Abhängigkeit des Wassergehaltes von Kaninchenerythrozyten von der Wasserstoffionenkonzentration.
Abszisse: Wasserstoffionenkonzentration.
Ordinate: Wassergehalt (g) pro Gramm Trockengewicht.
● Zeitpunkt 0 Minuten
○ Zeitpunkt 60 Minuten.
Einzelwerte finden sich in Tab. 7a und b des Anhangs.

Differenz zwischen Feuchtgewicht und Trockengewicht. Der Wassergehalt wurde dann pro Gramm Trockengewicht umgerechnet.) Der Wassergehalt nimmt also beim Kaninchen bei einer pH-Änderung um eine Einheit um 16 % zu. Bei den übrigen Arten ist die Änderung etwas geringer, am geringsten bei der Katze (Abb. 9).

Beim Vergleich der einzelnen Spezies fällt auf, daß alle Arten - ausgenommen die Katze - im Gegensatz zum Verhalten gegenüber den Polyolen ungefähr gleich viel ^{14}C-Fumarsäure aufnehmen. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Fumarsäureaufnahme zum Zeitpunkt 60 Minuten herausgreift (Abb. 10).

b) Einfluß der Porenladung auf den Durchtritt von positiv geladenen Molekülen

Abhängigkeit des Tetramethylammoniumdurchtritts von der Wasserstoffionenkonzentration bei verschiedenen Arten.

Zur Prüfung der passiven Durchlässigkeit eignen sich nur Stoffe, die keinem aktiven Transport unterliegen. Der Bergauftransport von Natrium und

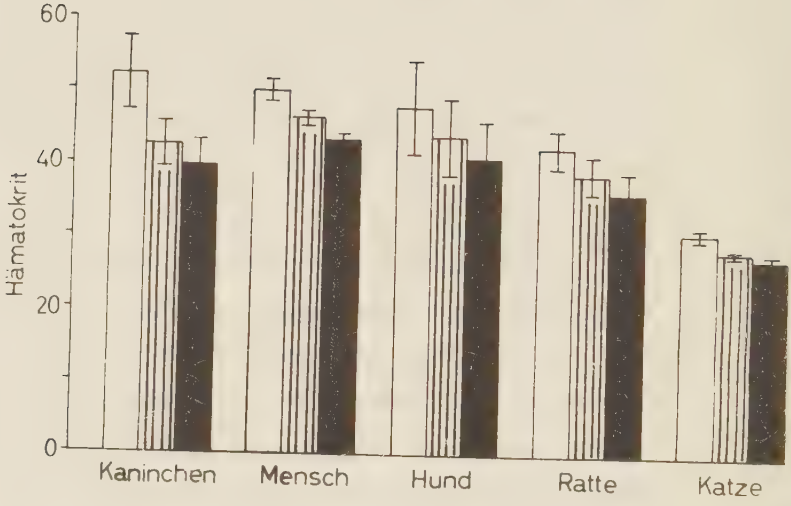

Abb. 9

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Erythrozytenvolumen verschiedener Spezies.
Ordinate: Hämatokrit.
Weiße Säulen = pH 6,5; gestreifte Säulen = pH 7,0; schwarze Säulen = pH 7,5.
Einzelwerte finden sich in Tabelle 8 des Anhangs.

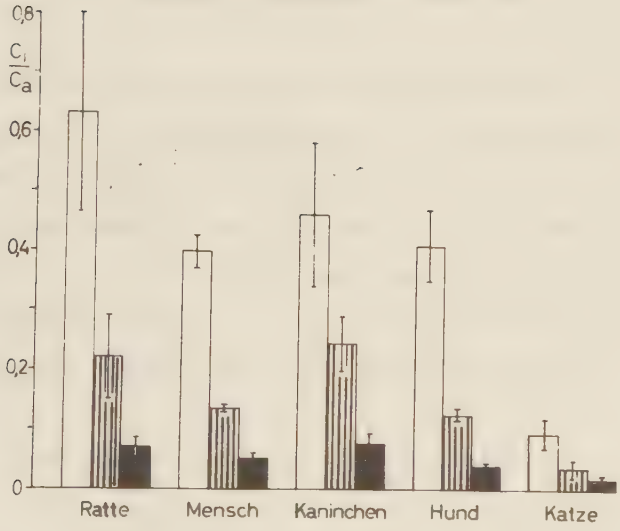

Abb. 10
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Fumarsäure in Erythrozyten verschiedener Spezies.
Ordinate: Verhältnis der Innenkonzentration zur Außenkonzentration nach 60 Minuten.
Weiße Säulen = pH 6,5; gestreifte Säulen = pH 7,0; schwarze Säulen = pH 7,5.
Einzelwerte finden sich in Tabelle 9 des Anhangs.

Kalium läßt sich beim Kaninchenerythrozyten mit Ouabain blockieren. Damit ist seine Abhängigkeit von biochemischen Prozessen erwiesen.

Die Abbildungen 11a und 11b zeigen, daß eine auf den Kalium- und Natriumtransport sicher wirksame Konzentration von Ouabain (10 µg/ml Erythrozytensuspension) weder auf die Aufnahme noch auf die Abgabe von TMA einen Einfluß hat. Eine direkte oder indirekte Beeinflussung durch einen Transportmechanismus kann somit ausgeschlossen werden.

Die Zahlen für die Aufnahme von TMA über einen Zeitraum von 3 Stunden bei verschiedenen Spezies findet sich in Tabelle 11 des Anhangs. Die Kurven verlaufen in dem Versuchszeitraum weitgehend linear und sind deshalb im einzelnen graphisch nicht wiedergegeben. Ein Gleichgewicht wird in der Versuchszeit nicht erreicht. Zum Vergleich sind in der Abbildung 12 die in 120 Minuten aufgenommenen Mengen zusammengestellt. Es zeigt sich, daß im Gegensatz zur Fumarsäure hinsichtlich der Gesamtaufnahme und der pH-Abhängigkeit große artspezifische Unterschiede vorhanden sind. Ratte und Kaninchen haben eine hohe Permeabilität für die quarternäre Ammo-

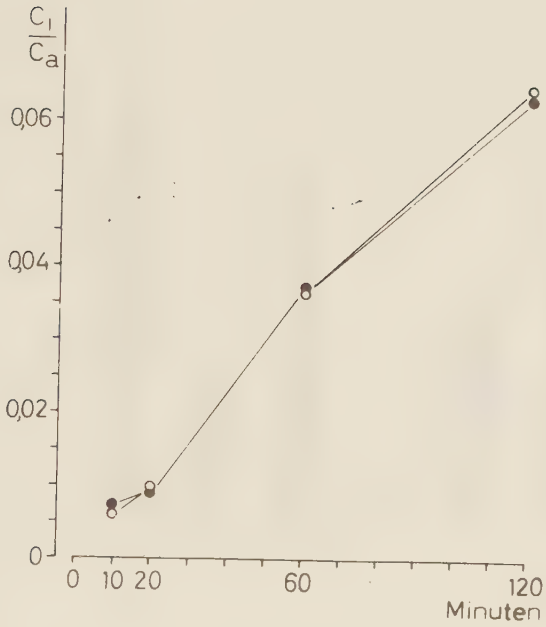

Abb. 11a

Einfluß von Ouabain auf die Aufnahme von TMA in Kaninchenerythrozyten.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Verhältnis der Innenkonzentration zur Außenkonzentration.

●———● ohne Ouabain

○———○ mit Ouabain

Einzelwerte finden sich in Tabelle 10 des Anhangs.

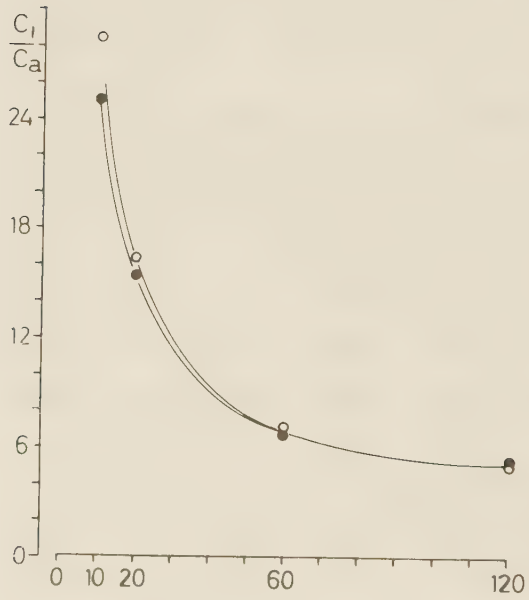

Abb. 11b

Der Einfluß von Ouabain auf die Abgabe von TMA aus Kaninchenerythrozyten.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Verhältnis der Innenkonzentration zur Außenkonzentration.

●———● **ohne Ouabain**

○———○ **mit Ouabain**

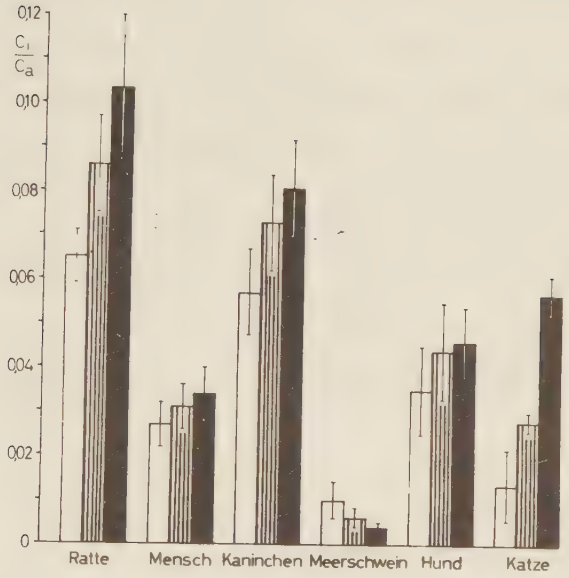

Abb. 12

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von TMA in Erythrozyten verschiedener Spezies.

Ordinate: Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration (c_i:c_a) nach 120 Minuten.

Weiße Säulen = pH 6,5; gestreifte Säulen = pH 7,0; schwarze Säulen = pH 7,5.

Signifikanz:	pH 6,5 zu 7,0	7,0 zu 7,5
Ratte	$p < 0,01$	$p = 0,05$
Mensch	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Kaninchen	$p < 0,05$	$p > 0,05$
Meerschweinchen	$p = 0,05$	$p = 0,05$
Hund	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Katze	$p < 0,01$	$p < 0,01$

niumverbindung. Mensch, Katze und Hund nehmen eine Mittelstellung ein. Beim Meerschweinchen wird die niedrigste Aufnahmerate gefunden. Eine im Sinne der theoretischen Erwartung erhöhte Aufnahme von TMA mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration läßt sich an Erythrozyten von Ratte, Kaninchen und Katze nachweisen. Sie fehlt oder läßt sich wegen des geringen pH-Einflusses bei Mensch und Hund statistisch nicht sichern. Beim Meerschweinchen dagegen wird die TMA-Aufnahme mit steigendem pH kleiner.

Der Nachweis von pH-Maxima für den Kalium-Natriumdurchtritt bei Kaninchenerythrozyten gab Anlaß, auch bei Meerschweinchenerythrozyten nach pH-Maxima zu suchen. Die Abbildung 13 zeigt, daß die Aufnahmerate mit Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration fast linear abnimmt.

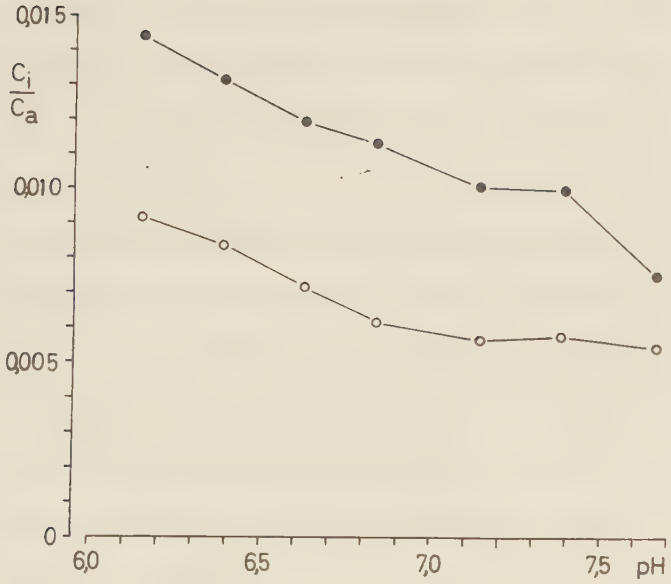

Abb. 13

Aufnahme von TMA in Meerschweinchenerythrozyten innerhalb einer pH-Reihe.

Abszisse: Wasserstoffionenkonzentration

Ordinate: Verhältnis der Innenkonzentration zur Außenkonzentration.

○———○ Inkubationsdauer 60 Minuten

●———● Inkubationsdauer 120 Minuten

IV. DISKUSSION

Die Zellmembran besteht nach DANIELLI (1) aus einer Eiweißschicht von 20 bis 30 Å Dicke. Darunter liegen Palisaden aus Lipoidmolekülen von etwa 50 Å Dicke. Sie werden gegen das Innere wieder von einer Eiweißschicht abgegrenzt. Die Membran wird an vielen Stellen dadurch durchbrochen, daß der auf der Oberfläche befindliche Proteinfilm durch die Membran hindurch zur Unterseite zieht und dabei Kanäle bildet, durch die ein Austausch wasserlöslicher Stoffe möglich ist. Dieses Modell wurde durch elektronenoptische Aufnahmen der Zellmembran weitgehend bestätigt. Der direkte Nachweis der Poren steht allerdings noch aus.

Wenn dieses Modell zutrifft, sollte es möglich sein, mit Hilfe verschiedener Testmoleküle, die durch derartige Kanäle hindurchtreten, Informationen über deren Eigenschaften zu gewinnen. Es wurde bei Erythrozyten verschiedener Arten versucht, Informationen über zwei Eigenschaften der Kanäle zu erhalten:

1. Die Größe des Durchmessers und dessen Beeinflußbarkeit durch die Wasserstoffionenkonzentration.

2. Das Vorhandensein von Fixladungen und ihren Einfluß auf den Durchtritt von An- und Kationen.

Es zeigte sich, daß Polyole nur bis zu einer bestimmten Molekülgröße in meßbarer Menge in die Erythrozyten eintreten (vgl. Tab. 1). Erythrit wurde von den Erythrozyten aller untersuchter Tierarten noch aufgenommen; am höchsten war die Aufnahme durch die Erythrozyten von Ratte und Mensch. Adonit wurde nur von Erythrozyten des Menschen und der Ratte aufgenommen. Eine Aufnahme von Mannit war mit unserer Methode bei keiner der untersuchten Erythrozytenarten nachweisbar.

Vorausgesetzt, daß die zugrunde gelegten Vorstellungen zutreffen, ist aus diesen Resultaten zu schließen, daß die Erythrozyten von Mensch und Ratte einen mittleren Porenradius von etwa 3,53 Å haben (vgl. Abb. 2). Der Unterschied im Molekülradius von Mannit und Adonit beträgt nur 0,19 Å, der zwischen Mannit und Erythrit 0,27 Å. Mannit ist also nur 1,08 mal größer als Erythrit, Adonit nur 1,02 mal (vgl. Abb. 2). Es ist überraschend, daß dieser kleine Unterschied ausreicht, den Durchtritt unmöglich zu machen. Wir wollen dabei noch einmal darauf hinweisen, daß diese Aussagen nur dann Gültigkeit be-

sitzen, wenn die untersuchten Polyole wirklich durch Kanäle in die Erythrozyten eintreten. Allerdings ist das diskontinuierliche Verhalten im kritischen Bereich in Abhängigkeit von einem HCOH-Glied mehr oder weniger auch dann nicht besser zu verstehen, wenn man davon ausgeht, daß die Polyolmoleküle nicht durch Poren hindurchtreten, sondern daß sie sich in der Membran lösen und so hindurchdiffundieren.

Aus den mit den Testmolekülen gewonnenen Ergebnissen muß außerdem geschlossen werden, daß der Porendurchmesser bei den verschiedenen Arten nicht sehr unterschiedlich sein kann. Auch die effektive Gesamtporenfläche scheint bei den untersuchten Arten nicht sehr unterschiedlich zu sein, da beim Kaninchen eine Halbwertszeit von 58 Minuten und bei Rind und Katze von 125 bzw. 130 Minuten nachgewiesen wurde (vgl. Tab. 2). Dieser Unterschied ist kleiner als der, der bei Ratte oder Mensch zwischen der Halbwertszeit von Erythrit und Adonit gefunden wurde und der - falls die Prämissen stimmen - durch einen nur geringen Größenunterschied im Molekül bedingt ist.

Die Untersuchungen zeigten ferner, daß der Durchtritt von ungeladenen Stoffen durch eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration nicht verändert wird: Im pH-Bereich von 6,0 - 8,0 änderten sich weder die Durchtrittsgeschwindigkeiten (vgl. Abb. 3), noch die kritische Molekülgröße. Bei früheren Arbeiten von PFLEGER, RUMMEL und SEIFEN (16, 20) sowie GERLACH (7) war eine Permeabilitätszunahme der Erythrozytenmembran für Kationen und Phosphat mit Ausbildung von Durchtrittsmaxima bei Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration gefunden worden. Da die hier verwendete Methode sehr empfindlich geringe Unterschiede im Kanaldurchmesser anzeigt, kann nunmehr ausgeschlossen werden, daß die in den genannten Arbeiten beschriebenen Besonderheiten auf einer Änderung des Porenradius beruhten.

Eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration geht - wie Hämatokritbestimmungen zeigen - mit einer Änderung des Erythrozytenvolumens einher (vgl.Abb.9). Es war nicht selbstverständlich, daß diese Volumenänderung keinen Einfluß auf den Porenradius hat. Es scheint hier so zu sein, daß die bei normalem pH-Wert bikonkave Gestalt der Erythrozyten in die Kugelform übergehen kann, ohne daß sich die Membranspannung und damit die Porengröße ändert. Im übri-

gen haben von KATCHALSKY durchgeführte Messungen ergeben, daß die Erythrozytenmembran die mechanische Festigkeit von Nylongewebe besitzt (12).

Im Gegensatz zur Aufnahme der Nichtelektrolyte ist die Aufnahme der n e g a t i v geladenen F u m a r s ä u r e von der Wasserstoffionenkonzentration a b h ä n g i g : mit steigender Wasserstoffionenkonzentration nimmt die Aufnahme von Fumarsäure zu (vgl. Abb. 7 und 10). Dieser Befund zeigt an, daß negative Fixladungen in der Erythrozytenmembran bzw. in deren Poren die gleichsinnig geladenen Fumarsäuremoleküle behindern. Die beiden pK-Werte der Fumarsäure sind mit 3,02 und 4,32 angegeben. Die Fumarsäure ist demnach im untersuchten pH-Bereich nahezu vollständig dissoziiert, d.h. die geringe Dissoziationsänderung mit der Wasserstoffionenkonzentration ist für die Aufnahme in die Erythrozyten unerheblich. Wenn trotzdem eine pH-abhängige Änderung der Aufnahmerate nachgewiesen wird, kann dies nur bedeuten, daß sich innerhalb des untersuchten pH-Bereichs die Zahl der Fixladungen in der M e m b r a n ändert. Es folgt daraus außerdem, daß in der Membran negative Fixladungen vorhanden sind, die sich so verhalten, als läge ihr pK-Wert zwischen 6 bis 8: die Aufnahmerate für Fu-

marsäure steigt von pH 7,5 nach 6,5 etwa um das 3-fache an (vgl. Abb. 7b), also um einen Betrag von der Größenordnung, wie er in der Nähe desjenigen pH-Wertes zu erwarten ist, der dem pK-Wert zahlenmäßig entspricht. Die untersuchten Erythrozytenarten unterscheiden sich darin nicht wesentlich voneinander. Lediglich die Katze bildet eine Ausnahme: die Gesamtzunahme und auch der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration sind niedriger als bei den anderen Arten (vgl. Abb. 10). Es sieht so aus, als seien bei der Katze im pH-Bereich zwischen 6 und 8 die negativen Fixladungen bereits weitgehend dissoziiert und würden durch die Wasserstoffionenkonzentration im Suspensionsmedium wenig beeinflußt, d.h. der pK-Wert bei der Katze müßte niedriger liegen als bei den anderen Arten. Andererseits könnte der Unterschied zwischen Katzenerythrozyten und den übrigen Arten auch dadurch bedingt sein, daß bei der Katze eine geringere Anzahl von Poren, die für negative Ladungen durchlässig sind, vorhanden ist. Die Messungen des Durchtritts von Polyolen ergaben jedoch dafür keinen Hinweis.

Mit Hilfe von T e t r a m e t h y l a m m o n i u m läßt sich nachweisen, daß auch die Aufnahme von p o s i t i v geladenen Ionen von der Wasser-

stoffionenkonzentration abhängt (vgl. Abb. 12). Allerdings ließ sich für TMA im untersuchten pH-Bereich kein Maximum nachweisen, wie es für Kalium- und Natriumionen gefunden wurde. Bei allen Arten außer dem Meerschweinchen nimmt der Erwartung entsprechend die Aufnahme von TMA mit Erniedrigung der Wasserstoffionenkonzentration zu. Vergleicht man die Aufnahmeraten von TMA (vgl. Abb. 12) und Fumarsäure (vgl. Abb. 10), so stellt man fest, daß bei pH 7,5 größenordnungsmäßig gleich viel TMA wie Fumarsäure aufgenommen wird. Dies war zunächst nicht zu erwarten, da zwischen der Aufnahme der ebenfalls negativ geladenen Chlorionen und den Natrium- und Kaliumionen ein Unterschied von 10^4 besteht (15). Sieht man von den Meerschweinchenerythrozyten ab, so ist auch die Aufnahme von TMA der Theorie entsprechend von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig, d.h. mit Erhöhung des pH-Wertes nimmt auch die Aufnahme für TMA zu. Allerdings ist die pH-Abhängigkeit bei den Erythrozyten von Ratte, Mensch und Hund geringer als sie für den Durchtritt von Fumarsäure beobachtet wurde. Bei der Katze, bei der im Vergleich zu den anderen Arten die geringste pH-Abhängigkeit der Erythrozyten für die Fumarsäure gefunden wurde, ist der größte pH-Einfluß für die TMA-Aufnahme nachweisbar. Die Meer-

schweinchenerythrozyten verhalten sich ganz entgegengesetzt: mit Erniedrigung der Wasserstoffionenkonzentration im Suspensionsmedium nimmt der TMA-Influx signifikant ab (vgl. Abb. 12).

Bei einer Gegenüberstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Aufnahme des positiv geladenen TMA mit der Aufnahme von Natriumionen (Tab. 4) läßt sich zwischen den untersuchten Erythrozytenarten keine Parallelität finden. Für einen Vergleich der Aufnahme der negativ geladenen Fumarsäure mit Chlor fehlen wegen der großen technischen Schwierigkeiten für die Messung der Chloraufnahme entsprechende Werte. Selbst zwischen den Werten, die mit den nahe verwandten Testmolekülen Fumarsäure und Erythrit gewonnen wurden, läßt sich keine Korrelation erkennen.

Wie sind nun diese Befunde zu erklären bzw. war überhaupt zu erwarten, daß sich zwischen den mit so verschiedenen Testmolekülen gewonnenen Permeabilitätsdaten für Erythrozyten verschiedener Spezies eine Korrelation finden ließe? Die in der Tabelle 4 verglichenen Moleküle haben eigentlich jeweils nur das eine gemeinsam, daß sie An- oder Kationen sind. Im übrigen unterscheiden sie sich in vielerlei Hinsicht beträchtlich. Das gleiche gilt

Erythrozyten von	TMA-Aufnahme nach 120 min in % des Angebots	Natrium-Aufnahme nach 60 min in % des Angebots aus isot.[2]		Fumarsäure-aufnahme nach 60 min in % des Angebots	Erythrit-aufnahme t/2 in min	Kationen-Konz. in µAq./ml[1]	
		NaCl	Cholin-Cl			Na	K
Ratte	8,6	1,17	2,47	22,0	28	16,0	78,0
Mensch	3,1	0,71	1,13	13,0	29	11,5	96,0
Kaninchen	7,3	2,98	17,04	24,0	58	20,0	88,0
Meerschweinch.	0,6	1,55	3,69	-	95	6,5	77,0
Hund	4,5	-	-	13,0	120	106,0	7,0
Katze	2,8	2,09	10,24	4,0	130	91,0	4,0

Tab. 4

[1] D.E. DUGGAN, J.E. BAER und R.M. NOLL, Naturwissenschaften 10, 264 (1965)

[2] K. PFLEGER, unveröffentlichte Arbeiten

offenbar für die chemischen und physikochemischen Eigenschaften der Membranen von Erythrozyten verschiedener Spezies. Diese Unterschiede müssen deshalb zur Auswirkung gelangen, weil es sich bei den Poren nicht um Kanäle handelt, durch die Wasser tritt, in dem die Testmoleküle frei gelöst sind. Sowohl die Festionen der Kanalwand als auch die Testmoleküle sind mit einem mehrschichtigen Wassermantel umgeben. MULLINS (14) nimmt an, daß Ionen unter Abstreifen eines Teiles ihres eigenen Hydratationswassermantels in die Poren hineinschlüpfen können, wobei sie Hydratationswasser der Fixladungen übernehmen. Hierbei scheint es von geringen Größenunterschieden abzuhängen, ob das Ion leicht oder nur schwer eintreten kann, d.h. ob es "paßt" (to fit closely), oder ob es seinen Hydratationsmantel nicht austauschen kann und daher draußen bleiben muß. Unter diesem Gesichtspunkt wird verständlich, daß selbst zwischen der Durchlässigkeit der Kationen Natrium und TMA bei den verschiedenen Erythrozytenarten keine Korrelation nachweisbar ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen mit ungeladenen (Polyolen), mit negativ geladenen (Fumarsäure) und mit positiv geladenen Molekülen (Tetramethylammonium = TMA) an Erythrozyten verschiedener Tierarten durchgeführt.

1. Die Polyole wurden als Testmoleküle deshalb benützt, weil sie eine vernachlässigbare Lipoidlöslichkeit besitzen, gut wasserlöslich und nicht ionisiert sind. Zur Bestimmung der Aufnahme dieser Stoffe in die Erythrozyten wurde eine von WILBRANDT entwickelte Methode modifiziert, die darauf beruht, daß die in einer Erythrozytensuspension auftretende Lichtstreuung dem Volumen der in dieser Suspension vorhandenen Erythrozyten umgekehrt proportional ist.
   Es ergaben sich folgende Resultate:
   a) Kritische Molekülgröße: Die Erythrozyten von Ratte, Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen, Schwein, Hund, Rind und Katze sind für Erythrit (mittlerer Molekülradius = 3,45 Å) gut durchgängig. Adonit (3,53 Å) kann nur bei Mensch und Ratte eindringen. Für Mannit (3,72 Å)

konnte keine Aufnahme nachgewiesen werden.

b) pH-Abhängigkeit des Porenradius: Der Eintritt der untersuchten Polyole war zwischen pH 6,0 und 8,0 von der Wasserstoffionenkonzentration unabhängig.

c) Effektive Porenfläche: Ratte und Mensch besitzen eine dreimal größere Gesamtporenfläche als Hund und Katze.

d) Temperaturabhängigkeit: Diese Versuche wurden mit Äthylenglycol und Glycerin durchgeführt und ergaben für ersteres einen Q_{10}, der größer 2 und für letzteres 3 bis 4 ist.

2. Mit ^{14}C-Fumarsäure bzw. TMA wurde im pH-Bereich 6,5 bis 7,5 der Einfluß der Porenladung auf positiv und negativ geladene Stoffe untersucht.

a) Für die Aufnahme von Fumarsäure stellt sich nach rund 180 Minuten ein Gleichgewicht ein, das bei Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration um eine halbe Einheit zwei- bis dreimal höher lag. Beim Vergleich der einzelnen Erythrozytenarten ergab sich, daß innerhalb des gleichen pH-Bereiches die Erythrozyten aller Arten - ausgenommen die der Katze, bei denen die Werte niedriger liegen - etwa gleichviel Fumarsäure aufnehmen.

b) Bei TMA war die Aufnahme ebenfalls pH-abhängig. Mit sinkender Wasserstoffionenkonzentration nahmen alle untersuchten Erythrozytenarten mehr TMA auf. Nur bei Meerschweinchenerythrozyten war das Umgekehrte der Fall. Ein Gleichgewicht wurde innerhalb der Versuchszeit von 180 Minuten nicht erreicht. Bei einem Vergleich der Aufnahme nach 120 Minuten ergaben sich große artspezifische Unterschiede: Die Erythrozyten von Ratte und Kaninchen zeigen eine hohe Aufnahme. Mensch, Katze und Hund nehmen eine Mittelstellung ein. Von Meerschweinchenerythrozyten wurde am wenigsten aufgenommen.

In der Diskussion wurde vom Verhalten der Testmoleküle auf den pK-Wert der Fixladungen der Erythrozytenmembran geschlossen: Die Fixladungen verhalten sich - mit Ausnahme der der Katzenerythrozyten - so, als läge ihr pK-Wert zwischen 6 und 8. Der pK-Wert der Katzenerythrozyten dürfte niedriger liegen.

VI. TABELLARISCHER ANHANG

Tab. 1

Bestimmung des mittleren Molekülradius der benützten Polyole.

a) mittlerer Molekülradius = $r = 0{,}5 \sqrt[3]{d_1 \cdot d_2 \cdot d_3}$

Die einzelnen Moleküle wurden mit Atomkalotten nach STUART und BRIEGLEB der Firma Leybold aufgebaut. Dann wurden die Längen dreier aufeinander senkrecht stehender Moleküldurchmesser bestimmt, wobei sich die Moleküle in ihrer sterisch größten und kleinsten Konfiguration befanden. Der größte und kleinste Radius wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$r = 0{,}5 \sqrt[3]{(d_1 d_2 d_3)}$$

wobei d_1, d_2, d_3 die aufeinander senkrecht stehenden Durchmesser sind.

Polyole	größter Radius Å	kleinster Radius Å	mittlerer Radius Å
Äthylenglycol	2,72	2,68	2,70
Glycerin	3,12	3,00	3,06
Erythrit	3,54	3,36	3,45
Adonit	3,74	3,32	3,53
Mannit	3,86	3,58	3,72

b) mittlerer Molekülradius = $\sqrt[3]{\frac{3\,M}{4\,\pi\,\varphi\,N}}$

Polyole	M	φ	mittlerer Radius Å
Äthylenglycol	62,07	1,1155	2,78
Glycerin	92,09	1,2600	3,04
Erythrit	122,12	1,3179	3,30
Mannit	182,17	1,4890	3,65

M = Molekulargewicht, φ = Dichte, N = Avogadrosche Zahl ($6{,}02 \cdot 10^{23}$)

Tab. 2

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Erythrit in verschiedene Erythrozytenarten.

Angegeben sind die Mittelwerte (n = 3-5) in Photometereinheiten (siehe Methodik) bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60
pH 6,5	70,0	63,0	55,0	31,0	12,5	4,5	4,5
pH 7,0	70,0	60,0	55,5	30,0	13,0	4,0	4,0
pH 7,5	70,0	64,0	54,5	29,0	12,0	4,5	4,0

Tab. 2a

Rattenerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50
pH 6,5	70,0	52,5	43,0	38,0	19,5	8,5
pH 7,0	70,0	51,0	42,0	36,0	20,0	10,0
pH 7,5	70,0	53,0	43,5	37,0	21,2	8,8

Tab. 2b

Menschenerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,0	70,0	64,6	60,0	53,5	46,5	38,0	26,8	19,8	11,8	9,1
pH 6,5	70,0	67,5	60,5	53,5	48,0	36,5	30,5	22,0	13,9	10,0
pH 7,0	70,0	65,5	59,0	53,0	46,3	38,5	30,3	19,3	11,0	7,0
pH 7,5	70,0	64,0	59,5	53,0	49,5	41,5	33,5	26,7	20,0	12,6
pH 8,0	70,0	64,0	59,0	53,0	48,0	43,0	35,5	27,0	19,0	14,0

Tab. 2c

Kaninchenerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,0	70,0	70,0	64,0	58,0	54,5	51,0	46,5	45,0	41,5	39,0
pH 6,5	70,0	68,0	64,0	58,5	52,0	49,0	46,0	41,0	41,0	38,5
pH 7,0	70,0	70,0	64,0	58,0	54,5	49,0	47,5	42,0	40,5	39,0
pH 7,5	70,0	76,5	63,5	58,5	53,0	49,5	47,5	42,5	41,5	38,0

Tab. 2d

Meerschweinchenerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,5	70,0	67,0	67,0	63,0	58,0	53,0	50,0	45,0	39,0	35,0
pH 7,0	70,0	69,0	68,0	61,0	57,0	55,0	50,0	47,0	42,0	38,0
pH 7,5	70,0	68,0	65,5	62,0	59,0	54,5	51,0	46,0	40,5	36,0

Tab. 2e

Schweineerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,5	70,0	72,0	66,6	62,5	59,0	58,0	56,0	53,8	51,5	47,5
pH 7,0	70,0	67,5	63,5	53,8	51,0	49,5	48,5	47,0	46,5	41,0
pH 7,5	70,0	67,5	60,0	56,0	51,5	50,0	48,0	47,5	46,0	43,0

Tab. 2f

Hundeerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,0	70,0	71,5	71,5	69,0	65,5	59,5	54,5	52,0	45,5	41,5
pH 6,5	70,0	71,0	69,0	68,0	64,0	61,5	55,5	53,0	49,0	45,0
pH 7,0	70,0	70,0	68,0	63,0	61,0	60,0	52,0	50,0	49,0	45,5
pH 7,5	70,0	68,5	67,0	64,5	60,0	58,5	53,5	51,0	48,0	45,0

Tab. 2g

Rindererythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,5	70,0	69,0	67,5	64,0	59,0	54,0	48,5	42,5	29,5	18,5
pH 7,0	70,0	67,0	66,0	62,0	60,0	57,5	54,5	50,0	45,0	40,0
pH 7,5	70,0	68,0	65,5	63,0	60,5	59,5	56,0	55,3	53,5	49,5

Tab. 2h

Katzenerythrozyten

Tab. 3

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Adonit in Menschen- und Rattenerythrozyten.

Angegeben sind die Mittelwerte (n = 4) in Photometereinheiten (siehe Methodik) bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,5	70,0	73,0	70,0	69,0	65,0	63,0	58,0	58,0	55,5	54,5
pH 7,0	70,0	67,0	67,0	65,0	64,0	61,0	59,0	58,0	57,0	56,0
pH 7,5	70,0	68,0	67,0	68,0	63,0	63,0	59,5	60,0	59,0	58,0

Tab. 3a

Menschenerythrozyten

Zeit in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH 6,5	70,0	73,0	66,0	62,5	60,0	58,5	54,5	54,5	48,5	47,5
pH 7,0	70,0	66,0	70,0	62,5	59,5	59,5	53,0	51,0	56,0	50,0
pH 7,5	70,0	70,0	68,0	63,0	60,0	59,0	54,0	52,0	55,0	49,5

Tab. 3b

Rattenerythrozyten

Tab. 4

Natriumverlust von Katzenerythrozyten in einer isotonen Adonitlösung.

Erythrozyten aus je 2 ml defibriniertem Blut wurden zweimal gewaschen und mit 16 ml isotoner Adonitlösung und 4 ml $^{n}/15$ K^{+}-Puffer von pH 7,5 bei 27^{o} C inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden je 0,5 ml Erythrozytensuspension zur photometrischen Bestimmung des Erythrozytenvolumens (Einzelheiten wurden im methodischen Teil beschrieben) und je 1 ml zur Bestimmung des intrazellulären Natriums entnommen. Zur Natriumbestimmung wurden die entnommenen Erythrozyten in 4 ml Cholinchlorid gewaschen. Der nach Abzentrifugieren gewonnene Erythrozytenanteil wurde mit 5 ml Aqua dest. zur Messung aufgenommen.

Angegeben sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen bei 2 Tieren.

Inkubationszeit in Minuten	Streulicht in Photometereinheiten	Intracelluläres Na^{+} in % des Nullwertes (100% = 165 µMol Na^{+}/ml)
0	80,0	100,0
10	83,0	88,6
20	85,0	86,4
40	91,6	79,7
60	116,0	65,9
100	164,0	33,1

Tab. 5

Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme von Äthylenglycol und Glycerin in Kaninchenerythrozyten.

(Mittelwerte aus n = 3).

Zeit in Sekunden	Streulicht in Photometereinheiten Äthylenglycol		Glycerin		
	7° C	17° C	7° C	17° C	27° C
6	-	34,0	-	-	-
8	44,5	27,5	-	-	-
10	40,0	22,0	-	-	56,3
12	-	18,0	-	-	-
14	-	16,5	-	-	54,0
15	31,6	14,0	-	62,0	53,0
20	24,6	-	-	-	47,0
25	21,3	-	-	-	43,5
30	18,0	-	61,5	50,8	39,5
45	-	-	-	44,5	-
60	-	-	58,5	42,0	26,0
90	-	-	54,5	38,0	-
120	-	-	52,0	35,0	-
150	-	-	50,0	32,0	-
180	-	-	48,5	28,0	-
210	-	-	46,0	25,0	-
240	-	-	45,0	22,0	-
270	-	-	43,0	21,0	-
300	-	-	42,5	20,0	-
330	-	-	41,5	19,0	-
360	-	-	39,5	-	-
390	-	-	38,5	-	-
420	-	-	37,5	-	-
450	-	-	36,0	-	-
480	-	-	35,0	-	-
510	-	-	33,0	-	-
540	-	-	32,5	-	-
900	-	-	22,0	-	-

Tab. 6

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Fumarsäure in Erythrozyten verschiedener Spezies.

Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Einzelwerten.

Erythrozyten von	pH	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i : c_a$ nach 5	10	20	40	60	120	180 Min.
	6,5	0,048	0,099	0,145	0,265	0,309	0,401	0,378
Kaninchen	7,0	0,023	0,051	0,078	0,142	0,189	0,227	0,227
	7,5	0,008	0,016	0,023	0,044	0,053	0,073	0,099
	6,5	0,038	0,071	0,160	0,253	0,318	0,368	0,364
Hund	7,0	0,011	0,023	0,050	0,083	0,109	0,147	0,175
	7,5	0,004	0,007	0,015	0,021	0,029	0,045	0,059
	6,5	0,035	0,067	0,144	0,263	0,354	0,468	0,476
Mensch	7,0	0,010	0,022	0,048	0,094	0,133	0,200	0,220
	7,5	0,003	0,007	0,019	0,040	0,051	0,055	0,114
	6,5	0,073	0,119	0,219	0,332	0,419	0,439	0,434
Ratte	7,0	0,028	0,039	0,074	0,112	0,145	0,189	0,205
	7,5	0,008	0,012	0,020	0,039	0,053	0,081	0,103
	6,5	0,011	0,015	0,034	0,053	0,065	0,090	0,096
Katze	7,0	0,004	0,008	0,014	0,017	0,020	0,023	0,028
	7,5	0,002	0,004	0,007	0,007	0,009	0,010	0,010

Tab. 6a

Erythrozyten von	pH	$c_t:c_G$ 5	10	20	40	60	120	180 Min.
	6,5	0,126	0,261	0,383	0,701	0,817	1,060	1,000
Kaninchen	7,0	0,101	0,224	0,343	0,625	0,832	1,000	1,000
	7,5	0,080	0,161	0,232	0,444	0,535	0,737	1,000
	6,5	0,104	0,194	0,439	0,695	0,873	1,010	1,000
Hund	7,0	0,062	0,131	0,285	0,474	0,622	0,840	1,000
	7,5	0,067	0,118	0,254	0,355	0,491	0,762	1,000
	6,5	0,073	0,140	0,302	0,552	0,743	0,983	1,000
Mensch	7,0	0,045	0,100	0,218	0,427	0,604	0,909	1,000
	7,5	0,026	0,061	0,166	0,350	0,447	0,482	1,000
	6,5	0,168	0,274	0,504	0,764	0,965	1,010	1,000
Ratte	7,0	0,136	0,190	0,360	0,546	0,707	0,921	1,000
	7,5	0,077	0,116	0,194	0,378	0,514	0,786	1,000
	6,5	0,114	0,156	0,354	0,552	0,677	0,937	1,000
Katze	7,0	0,142	0,285	0,500	0,607	0,714	0,821	1,000
	7,5	0,200	0,400	0,700	0,700	0,900	1,000	1,000

Tab. 6b

Die Werte der Tabelle 6a wurden umgerechnet nach $c_t:c_G$.

$c_t = c_i:c_a$ zur Zeit t

$c_G = c_i:c_a$ im Gleichgewicht. Als Bezugswert gilt $c_i:c_a$ nach 180 Minuten.

Tab. 7

Abhängigkeit des Wassergehaltes von Kaninchenerythrozyten von der Wasserstoffionenkonzentration (I und II sind Einzelversuche).

Trockengewicht = 0,21 g

pH	Feuchtgewicht(g)		Wassergehalt(g)		Wassergehalt(g) pro g Trockengew.	
	I	II	I	II	I	II
6,10	0,9350	0,8522	0,6862	0,6377	3,72	3,03
6,25	0,7929	0,7757	0,5919	0,5729	2,82	2,73
6,60	0,7466	0,7263	0,5439	0,6251	2,58	2,50
6,78	0,7212	0,7407	0,5072	0,5312	2,42	2,53
7,02	0,7000	0,7167	0,4958	0,5080	2,36	2,42
7,20	0,6692	0,6759	0,4650	0,4729	2,22	2,25
7,40	0,6871	0,6998	0,4708	0,4910	2,24	2,34
7,60	0,6190	0,6528	0,4187	0,4475	1,99	2,13
7,84	0,6253	0,6312	0,4190	0,4232	2,00	2,01
8,25	0,6006	0,5976	0,3975	0,3945	1,88	1,88

Tab. 7a

Zeitpunkt 0 Minuten

pH	Feuchtgewicht(g)		Wassergehalt(g)		Wassergehalt(g) pro g Trockengew.	
	I	II	I	II	I	II
6,10	0,7888	0,8415	0,4115	0,6329	1,95	3,10
6,25	0,8184	0,8198	0,6130	0,6174	2,92	2,94
6,60	0,7829	0,7773	0,5798	0,5729	2,78	2,73
6,78	0,7518	0,7524	0,5453	0,5465	2,60	2,60
7,02	0,7098	0,7141	0,5035	0,5046	2,40	2,40
7,20	0,6909	0,6839	0,4805	0,4759	2,29	2,26
7,40	0,6684	0,6577	0,4590	0,4525	2,19	2,15
7,60	0,6480	0,6405	0,4430	0,4349	2,11	2,07
7,84	0,5893	0,6182	0,3931	0,4178	1,87	1,99
8,25	0,5681	0,5900	0,3706	0,3888	1,76	1,84

Tab. 7b

Zeitpunkt 60 Minuten

Tab. 8

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Erythrozytenvolumen verschiedener Spezies.

Erythrozyten von	pH	Hämatokrit x_1	x_2	x_3	x_4	$\bar{x}$	σ	ε
	6,5	55,5	54,9	45,7	-	52,0	5,40	3,17
Kaninchen	7,0	44,5	44,5	38,8	-	42,6	3,29	1,89
	7,5	42,0	42,0	38,4	36,8	39,8	2,62	1,31
	6,5	49,0	48,6	50,0	52,4	50,0	1,70	0,85
Mensch	7,0	45,8	45,1	46,8	46,8	46,1	0,83	0,41
	7,5	42,7	42,4	42,7	45,3	43,3	1,36	0,67
	6,5	57,9	44,8	42,7	45,5	47,7	6,80	3,40
Hund	7,0	51,7	42,3	38,9	42,6	43,8	5,47	2,70
	7,5	48,4	39,8	36,0	39,5	40,9	5,20	2,60
	6,5	44,3	40,3	-	-	42,3	2,80	2,00
Ratte	7,0	40,6	37,1	-	-	38,8	2,47	1,75
	7,5	38,5	34,3	-	-	36,4	2,90	2,10
	6,5	30,0	29,6	30,9	31,3	30,5	0,61	0,30
Katze	7,0	28,5	28,0	28,1	28,2	28,2	0,20	0,10
	7,5	27,8	28,4	26,8	26,7	27,4	0,80	0,40

$x_1 - x_4$ = Einzelversuche

$\bar{x}$ = Mittelwert

σ = mittlere Abweichung

ε = mittlerer Fehler des Mittelwertes

Tab. 9

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von Fumarsäure in Erythrozyten verschiedener Spezies, dargestellt zum Zeitpunkt 60 Minuten.

Erythrozyten von	pH	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i : c_a$						
		x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	$\bar{x}$	σ
Kaninchen	6,5	0,58	0,59	0,44	0,40	0,31	0,46	0,120
	7,0	0,28	0,30	0,23	0,21	0,19	0,24	0,047
	7,5	0,09	0,09	0,07	0,07	0,05	0,08	0,020
Hund	6,5	0,45	0,43	0,48	0,38	0,32	0,41	0,063
	7,0	0,13	0,14	0,12	0,12	0,11	0,13	0,012
	7,5	0,04	0,04	0,05	0,03	0,03	0,04	0,007
Mensch	6,5	0,41	0,40	0,43	0,40	0,35	0,40	0,027
	7,0	0,12	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,003
	7,5	0,04	0,04	0,06	0,06	0,05	0,05	0,006
Ratte	6,5	0,87	0,71	0,66	0,50	0,42	0,63	0,177
	7,0	0,33	0,23	0,22	0,17	0,15	0,22	0,072
	7,5	0,10	0,07	0,06	0,06	0,05	0,07	0,018
Katze	6,5	0,13	0,09	0,10	0,08	0,07	0,09	0,026
	7,0	0,05	0,05	0,04	0,02	0,02	0,04	0,014
	7,5	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,008

$x_1 - x_5$ = Einzelwerte

$\bar{x}$ = Mittelwert

σ = mittlere Abweichung

Tab. 10

Einfluß von Ouabain auf die Aufnahme von TMA in Kaninchenerythrozyten.

Angegeben sind Mittelwerte aus drei Einzelversuchen. Die Ouabainkonzentration betrug 100 µg Ouabain/ml Erythrozytensuspension. Die Versuche wurden bei pH 7,5 durchgeführt.

Zeit in Minuten	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i : c_a$			
	Einstrom		Ausstrom	
	mit Ouabain	ohne Ouabain	mit Ouabain	ohne Ouabain
10	0,0075	0,0068	28,4	25,9
20	0,0140	0,0147	16,3	15,0
60	0,0370	0,0369	6,8	6,7
120	0,0630	0,0651	5,2	5,2

Tab. 11

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von TMA in Erythrozyten verschiedener Spezies.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 - 4 Einzelwerten.

Erythrozyten von	pH	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i:c_a$ nach						
		5	10	20	40	60	120	180 Min.
Kaninchen	6,5	0,0059	0,0086	0,0151	0,0254	0,0347	0,0523	0,00849
	7,0	0,0053	0,0102	0,0167	0,0353	0,0447	0,0688	0,1120
	7,5	0,0067	0,0114	0,0197	0,0353	0,0469	0,0787	0,1263
Katze	6,5	0,0018	0,0030	0,0045	0,0067	0,0084	0,0126	0,0173
	7,0	0,0017	0,0030	0,0067	0,0102	0,0138	0,0272	0,0444
	7,5	0,0023	0,0050	0,0146	0,0218	0,0314	0,0629	0,0915
Mensch	6,5	0,0039	0,0050	0,0071	0,0110	0,0150	0,0264	0,0358
	7,0	0,0022	0,0041	0,0067	0,0115	0,0174	0,0342	0,0440
	7,5	0,0022	0,0038	0,0080	0,0126	0,0188	0,0392	0,0536
Meerschweinchen	6,5	0,0021	0,0039	0,0041	0,0061	0,0069	0,0090	0,0105
	7,0	0,0010	0,0017	0,0025	0,0030	0,0040	0,0053	0,0060
	7,5	0,0006	0,0010	0,0018	0,0021	0,0029	0,0042	0,0048
Ratte	6,5	0,0038	0,0067	0,0129	0,0252	0,0358	0,0657	0,0951
	7,0	0,0041	0,0095	0,0183	0,0358	0,0472	0,0891	0,1220
	7,5	0,0047	0,0105	0,0211	0,0441	0,0607	0,1010	0,1407
Hund	6,5	0,0025	0,0042	0,0088	0,0142	0,0175	0,0255	0,0310
	7,0	0,0027	0,0045	0,0091	0,0164	0,0214	0,0326	0,0399
	7,5	0,0021	0,0041	0,0074	0,0144	0,0199	0,0341	0,0457

Tab. 12

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufnahme von TMA in Erythrozyten verschiedener Spezies, dargestellt zum Zeitpunkt 120 Minuten (Inkubationsdauer).

pH	6,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5
	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i : c_a$								
	Ratte			Mensch			Kaninchen		
x_1	0,035	0,050	0,063	0,014	0,017	0,018	0,033	0,039	0,041
x_2	0,064	0,091	0,101	0,026	0,029	0,035	0,051	0,066	0,088
x_3	0,095	0,130	0,143	0,036	0,045	0,052	0,085	0,123	0,118
x_4	0,037	0,046	0,060	0,014	0,016	0,021	0,036	0,045	0,049
x_5	0,067	0,088	0,104	0,022	0,031	0,039	0,049	0,063	0,072
x_6	0,095	0,115	0,144	0,020	0,044	0,012	0,085	0,114	0,122
x_7	0,070	0,100	0,126	0,037	0,017	0,037	0,066	0,078	0,082
x_8	0,064	0,091	0,101	0,052	0,033	0,050	0,051	0,066	0,088
x_9	0,057	0,078	0,086	0,013	0,043	0,021	0,051	0,074	0,071
x_{10}	0,072	0,092	0,120	0,024	0,018	0,039	0,072	0,090	0,098
x_{11}	0,067	0,088	0,104	0,030	0,042	0,053	0,049	0,063	0,072
x_{12}	0,057	0,069	0,086		0,042		0,051	0,068	0,073
$\bar{x}$	0,065	0,086	0,104	0,027	0,031	0,034	0,057	0,073	0,081
σ	0,006	0,011	0,017	0,005	0,005	0,006	0,010	0,011	0,011

$x_1 - x_{12}$ = Einzelwerte, $\bar{x}$ = Mittelwert, σ = mittlere Abweichung. Der Name der Tierart steht für die Erythrozytenart.

pH	6,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5
	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration $c_i : c_a$								
	Meerschweinchen			Hund			Katze		
x_1	0,007	0,004	0,003	0,024	0,028	0,028	0,009	0,014	0,032
x_2	0,009	0,005	0,004	0,034	0,043	0,047	0,013	0,029	0,061
x_3	0,011	0,006	0,005	0,038	0,053	0,062	0,008	0,047	0,091
x_4	0,007	0,005	0,006	0,023	0,029	0,026	0,012	0,014	0,032
x_5	0,009	0,004	0,004	0,034	0,042	0,046	0,017	0,026	0,067
x_6	0,010	0,006	0,003	0,044	0,054	0,062	0,018	0,043	0,096
x_7	0,014	0,008	0,006	0,048	0,056	0,056	0,013	0,028	0,064
x_8	0,009	0,005	0,004	0,034	0,043	0,047	0,016	0,029	0,061
x_9	0,006	0,004	0,003	0,023	0,031	0,037	0,012	0,028	0,058
x_{10}	0,014	0,005	0,003	0,046	0,058	0,052	0,010	0,028	0,064
x_{11}	0,009	0,004	0,004	0,034	0,042	0,046		0,026	0,067
x_{12}	0,006	0,008	0,005	0,026	0,032	0,037		0,026	0,058
$\bar{x}$	0,010	0,006	0,004	0,035	0,044	0,046	0,014	0,028	0,062
σ	0,004	0,002	0,001	0,010	0,011	0,008	0,008	0,001	0,004

x_1 - x_{12} = Einzelwerte, $\bar{x}$ = Mittelwert, σ = mittlere Abweichung. Der Name der Tierart steht für die Erythrozytenart.

Tab. 13

Aufnahme von TMA in Meerschweinchenerythrozyten innerhalb einer pH-Reihe.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

pH	Verhältnis der Innen- zur Außenkonzentration ($c_i : c_a$) nach einer Inkubationszeit von	
	60 Minuten	120 Minuten
6,15	0,0092	0,01455
6,39	0,0084	0,01320
6,63	0,0073	0,01199
6,84	0,0062	0,01146
7,16	0,0058	0,01018
7,38	0,0058	0,01015
7,67	0,0059	0,00774

VII. LITERATUR

1. DANIELLI, J. F.: Theory of penetration of a thin membrane. In: Permeability of natural membranes by C.U.P. Cambridge: Davson and Danielli (1943).

2. DANIELLI, J. F.: Surface phenomena in chemistry and biology (J. F. Danielli, K. G. A. Pankhurst and A. C. Riddiford, eds.) pp. 246 Pergamon Press, New York.

3. DUGGAN, D. E., J. E. BAER and R. M. NOLL: Membrane adenosintriphosphatase and cation composition of mammalian erythrocytes. Naturwissenschaften 10, 264 (1965).

4. DUNHAM, E. T. and I. M. GLYNN: Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. (London) 156, 274 (1961).

5. EGGERT, J.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie (1960). S. Hirzel Verlag Stuttgart.

6. EVANS, J. V. and J. W. B. KING: Genetic control of sodium and potassium concentrations in the red blood cell of the sheep. Nature 176, 171 (1955).

7. GERLACH, E., K. KLÜBEN und B. DEUTICKE: Studien über den Phosphatstoffwechsel in normalen und pathologischen Erythrozyten unter Verwendung von Radiophosphor (^{32}P).
Nucl.-Med. (Stuttg.) 2, Suppl. 1, 151 (1962).

8. GIEBEL, O. und H. PASSOW: Permeabilität der Erythrocytenmembran für organische Anionen.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 271, 378 (1960).

9. GREEFF, K. H., H. GROBECKER und U. PIECHOWSKI: Membran-ATPase und intrazellulärer Kationengehalt von Katzenerythrozyten.
Naturwissenschaften 51, 42 (1964).

10. JACOBS, M. H. and S. A. CORSON: The influence of minute traces of copper on certain hemolytic processes.
Biol. Bull. 67, 329 (1934).

11. JACOBS, M. H., H. N. GLASSMAN and A. K. PARPART: Osmotic properties of the erythrocyte.
VII. The temperature coefficients of certain hemolytic processes.
J. Cell. Comp. Physiol. 7, 197 (1935-36).

12. KATCHALSKY, A.: persönliche Mitteilung.

13. LEFEVRE, P. G.: Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane.
J. Gen. Physiol. 31, 505 (1948).

14. MULLINS, L. J.: An analysis of pore size in excitable membranes.
J. Gen. Physiol. 43, 105 (1960 II).

15. PASSOW, H.: Ion and water permeability of the red blood cell. In: The red blood cell. (Ed. C. Bishop and D. M. Surgenor Academic Press 1964) p. 71.

16. PFLEGER, K., W. RUMMEL und E. SEIFEN: Sodium and potassium permeability of red blood cells in dependence of pH. Pflügers Arch. ges. Physiol. 295, 255 (1967).

17. POST, R. L., C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING and C. D. ALBRIGHT: Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem. 235, 1796 (1960).

18. RENKIN, E. M.: Filtration, diffusion and molecular sieving trough porous cellulose membranes. J. Gen. Physiol. 38, 225 (1955).

19. ROELOFSEN, , J. de GIER and L. L. M. van DEENEN: Binding of lipids in the red cell membrane. J. Cell. Comp. Physiol. 63 II, 233 (1964).

20. RUMMEL, W., K. PFLEGER und E. SEIFEN: Die pH-Abhängigkeit von Aufnahme und Abgabe von anorganischem Phosphat an Erythrozyten. Biochem. Z. 330, 310 (1958).

21. SKOU, J. C.: The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem. Biophys. Acta 23, 394 (1957).

22. SKOU, J. C.: Encymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45, 596 (1965).

23. SOLOMON, A. K.: Bestimmung des mittleren Molekülradius mit Atomkalotten. J. Gen. Physiol. 43, 1 (1960).

24. TOSTESON, D. C.: Sodium and potassium transport in red blood cells. In: Electrolytes in biological systems. (A. M. Shanes, ed.), Washington, D. C., American Physiological Society, 123 (1955a).

25. TOSTESON, D. C. and J. F. HOFFMAN: Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J. Gen. Physiol. 44 I, 169 (1961).

26. WILBRANDT, W.: Zur Methodik der osmotischen Permeabilitätsmessung am Erythrocyten. Pflügers Arch. ges. Physiol. 250, 569 (1948).

Herrn Professor Dr. Rummel danke ich dafür, daß er es mir ermöglicht hat, die Arbeit in seinem Institut durchzuführen sowie für wertvolle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Pfleger für die Überlassung des Themas sowie Anleitung und Beratung bei der Durchführung der Versuche und beim Abfassen der Arbeit.

Lebenslauf

Am 22. September 1941 wurde ich, Ingo V o l k m e r, als erstes Kind des Zollbeamten Karl Volkmer und seiner Ehefrau Maria, Karolina, geb. Brengel in Homburg-Bruchhof geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Homburg-Bruchhof, daran anschließend das Staatliche Realgymnasium Homburg, wo ich im Februar 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1961 bis 1967 studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Dabei legte ich folgende Prüfungen ab: nach dem Wintersemester 1961/62 das Vorphysikum, nach dem Wintersemester 63/64 das Physikum und nach dem Wintersemester 66/67 das Staatsexamen.

Seit dem 11. August 1967 bin ich verheiratet und wohne in Homburg/Saar, Mannlichstraße 5.

Seit dem 15. September 1967 bin ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig.

ROTAPRINT-OFFSETDRUCKEREI

Klein

6602 Dudweiler · Scheidter Straße 26
Telefon Sulzbach 7 32 84
Drucksachen aller Art · Fotokopien
Spezialgebiet: Druck v. Dissertationen